第5卷 第2期
1984年 5月

动物学研究
ZOOLOGICAL RESEARCH

Vol. 5, No. 2
May, 1984

一种淡水涡鞭毛虫人工培养成功

周琨良 陈云鹤 宋承荣
(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

于1981年11月初，我们采到一种淡水涡鞭毛虫(甲藻) *Glenodinium gymnodinium* Penard，随即在实验室进行试探人工培养。所用的培养基为经改良的一个团藻培养基配方。我们采取过渡性的初步培养、纯化培养和扩大培养三步法，利用光强度800—1200勒克斯（Lux），每日照光10—12小时，一般室温在15—22°C（冬季不低于9°C，夏季不高于28°C）下，细胞已完全能正常的生长、繁殖而被培养成功。在对细胞的一些特征进行观察时，发现所培养的光薄甲藻是世界上较为罕见的含有两种不同类型的细胞核的涡鞭毛虫类生物。

前 言

淡水涡鞭毛虫类（又称甲藻）在实验室进行人工培养较海产的种类困难得多，因此能人工培养的淡水涡鞭毛虫种类远较海产种类为少。由于我们在研究真核细胞的起源和进化问题中，涡鞭毛虫类是非常重要的研究对象或实验材料，所以不但要求能采集到较多种类的涡鞭毛虫，而且也相应地需要解决实验室培养的问题。由于我国幅员广大，河流、湖泊及池沼到处繁布，淡水涡鞭毛虫的种类也相应会很丰富，能解决一些实验室人工培养问题，不论对研究工作的顺利进行或是资源利用方面都将会是有意义的。鉴于这种情况，我们顺便对淡水涡鞭毛虫的实验室人工培养工作进行了一些试探。现在已培养成功一个种，被报导如下。

材 料 与 方 法

(一) 涡鞭毛虫（甲藻）的来源 于1981年11月初采自昆明西山区花红洞的池沼中

* 本文的主要内容曾于1982年年底在厦门的全国藻类学会第三届年会上宣读；培养的光薄甲藻是由中国科学院水生生物研究所的魏印心和倪达书先生鉴定后定种的、在此谨致衷心的感谢！
本文1983年5月3日收到，1983年9月24日收到修改稿。

(海拔约2300米)。池中水温为15°C, pH 为8.5, 水色略呈棕黄色。采到的水样带回实验室镜检时, 选作培养的甲藻, 在一个视野中一般仅见三、四个细胞, 个别视野再多也方见到七、八个细胞。藻种后来经中国科学院水生生物研究所的魏印心和倪达书先生鉴定后定种为光薄甲藻 (*Glenodinium gymnodinium Penard*)。

(二) 培养液的制备 主要参考培养团藻 (Volvox) 的一个培养基配方 (Provasoli 等, 1959) 我们稍作了修改。其原法的成份和比例为:

配制1000毫升时的加入量		贮存液	克/100毫升
1	(毫升)	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	11.8
1	〃	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4.0
1	〃	Na_2glycerophosphate	5.0
1	〃	KCl	5.0
10	〃	glycylglycine	5.0
1	〃	biotin	25.0×10^{-6}
1	〃	B_{12}	15.0×10^{-5}
6	〃	PIV (微量金属元素溶液)	

用玻璃蒸馏水加至1000毫升后, 用1*N* NaOH调pH至8.0。

PIV 微量金属元素溶液的配制是先将0.75克的 Na_2-EDTA 螯合剂被溶解于1000毫升玻璃蒸馏水之后, 按所给的量加入下列五种盐而成。

	克/升
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.097克
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.041克
$ZnCl_2$	0.005克
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.002克
Na_2MoO_4	0.004克

我们具体应用的培养基是从原法中减去了甘氨酰甘氨酸; 维生素改用V 8 复合维生素溶液 (Provasoli等, 1957); 对每1000毫升培养液补加了50毫升土壤浸出液 (是用不肥不瘦的一公斤土, 加2公斤水, 煮沸三小时, 冷却, 三层滤纸过滤二次, 间隙灭菌三次制成)。最后的 pH 被调成8.5。配好的培养液再经滤器 (蔡氏漏斗) 过滤消毒后备用。

(三) 培养的条件和操作 培养用的器皿, 如试管、培养皿、方块碟、三角烧瓶及吸管等, 洗净后都进行常规的无菌消毒。专门用于分离细胞的玻璃细吸管, 在前端一厘米长的一段被拉制成50微米左右的内径。培养是在太阳光直接照射不到培养物的房间中进行。放培养物的架子上装有日光灯, 培养物处所受到的光照强度, 与自然散射光一起

测量，晴天之下，在上午 8 点时为 800 勒克斯 (lux)，下午两点时为1200勒克斯，培养物每日被照光10—12小时。因培养的房间是无空调设备的普通房间，所以一年四季中间或是一昼夜之间，温度是并不恒定的，但一年中大部份时间，室内温度皆在15°C—22°C左右，冬天有时低至 9 °C（房间中已加一个1000W的电炉之下），夏天有时高至28°C左右，最冷和最热之间的温差约19度，但是这一温差是从冬至夏，或从夏至冬慢慢渐变的；一日的温差则一般 3 — 5 度，不论是夏天或是冬天，除非很特殊的情况，都不会与此相差太大。

培养开始到完全成功，我们把培养过程大体上分为三个阶段进行。

（1）初步培养：新鲜采到的含涡鞭毛虫的原水，拿回到实验室后，倒或吸出约 3 — 4 毫升于方块碟中或小培养皿中，然后在解剖镜（50或100倍）下进行分离。细胞用50微米口径的毛细玻璃管吸出后，混集于事先装有过滤原水和人工培养液等半混合液的方块碟中，洗涤四至五道，最后用过滤原水与人工培养液等半混合液在方块碟中进行培养。方块碟有容积略大或略小的，据此有的加 3 毫升培养液，有的加 4 毫升或 5 毫升培养液，然后在解剖镜下用微细吸管从洗过的藻细胞混集液中吸一些放入方块碟中培养。根据起初几次粗略计数，3 毫升培养液的方块碟放入约300—400个细胞，5 毫升培养液的方块碟则放入约500—600个细胞。藻在方块碟中因趋光性强，密度分布并不均匀，所以不是一个个计数的情况下，吸管吸到的藻量相差一倍甚至一倍以上也是可能的。但是刚采集来的原水镜下观察，一个视野仅见数个细胞，而培养成功后每毫升的细胞密度可达两万个以上，所以说明同一种培养液内，细胞数量相差几个数量级也是能存活的。这个初步培养的最主要的目的是试探从野外采来的涡鞭毛虫能否在实验条件下，在人工培养液中存活下来，并进行生长繁殖。这一步是根本的，若看不到细胞能存活，并生长繁殖，就谈不上进一步的工作了。

（2）纯化培养：在初步培养过程中，涡鞭毛虫细胞不但正常存活，而且也能分裂繁殖之后，会难免地出现一些异种生物（小型的原生动物和绿藻之类生物）污染，所以接着需要进行纯化培养工作。在这一步培养中，我们采用了单个细胞培养和多个成群的细胞培养两种方法。单个细胞培养利用国产ＭＭ－1型微量混合器上的有机玻璃板孔（口径0.6厘米，深约0.8毫米）中进行。每块板上有96个孔，因此可同时培养单个细胞近 100个。用前有机玻璃板洗后在 75％酒精中浸泡约两小时，但为了防止除不尽的酒精影响细胞培养，故再用纯水中煮沸十分钟，稍加凉干后用于培养。每个孔中加入人工培养液至孔深的三分之二高，放入一个初步培养中挑出并经人工培养液洗涤三次的细胞，然后把有机玻璃板放在一个作湿室的玻缸中，上面盖上一块玻璃板，置培养架上培养。多个细胞一起成群培养者，为了便于观察仍用方块碟中进行。每个方块碟中加入 3 毫升人工培养液，然后镜监之下，用分离专用的微细吸管从初步培养液中，一个一个地吸出细胞，经过五块凹玻片的池中用人工培养液接连洗五次后，放入培养用的方块碟中。所放细胞数，每个方块碟不少于100个细胞，最多则1000个细胞上下。同样都放入湿室，置培养架上培养。单个细胞培养，每隔三日加一微滴（约10微升）人工培养液；多个成群培养的细胞则每周补加人工培养液一次，其量为 1 毫升。

（3）扩大培养：看到细胞在人工培养液纯培养中生长良好，且细胞普遍分裂繁殖

而细胞数量明显增加的基础上，进行扩大培养。其具体的办法是，挑选活动良好，细胞数量明显增加而又无污染的培养物，用一玻璃吸管把细胞连同培养液一起收集入10毫升试管（单个培养者）或100毫升锥形瓶（细胞成群培养者），然后各加入二倍体积的新鲜人工培养液，瓶口用经消毒的牛皮纸复盖上，置培养架上培养。随着细胞浓度的增加，每周补加入二倍体积的新鲜人工培养液，如此不断培养，直至任何所需要的量为止。

在培养过程中，我们初步对细胞的一些特征、分裂繁殖及生长曲线等作了观察和测定。

结 果 与 讨 论

我们自采到光薄甲藻（*Glenodinium gymnodinium Penard*）并着手在实验室人工培养工作到现在近两年的时间，藻细胞在我们所采用的培养液、培养条件和培养方法之下，被培养成功了。它们已经历了春夏秋冬四个时期，这表明它们在实验室人工条件下是能够全年生长繁殖的。现在光薄甲藻可以在实验室进行常规培养，传种接代，不断地繁殖下去。在本培养工作进行以前之几年，我们曾对另外一些淡水涡鞭毛虫应用几种培养方法进行过试培养，但是采来的细胞都不能很好地在人工培养液中生长繁殖，往往在四、五天细胞便会死完，个别培养曾存活达二月，但细胞数量不是增加，而是越来越减少而告终。因此本次试探培养成功关键是在于寻找到一个比较合适的人工培养液配方，其次是吸收了过去的经验，改进了培养方法的结果。

在培养过程中，特别是培养的早期阶段，其他一些单细胞生物（如纤毛虫，绿藻及一种小白虫等）的污染是常难免的，但是通过不断的分离纯化工作，最后完全能进行纯种培养（图版 I ：14）。

现将培养中所观察的一些结果叙述如下。

（一）细胞的形态和特点　成熟的细胞体长39—45.5微米，宽23—26微米；胞体略呈椭圆形（图版 I ：1），背腹稍扁，横沟环状，纵沟不明显；有2根鞭毛；胞体外部有一透明薄壳，壳上无板块和纹理，遇到不适环境时，胞体会逐渐收缩成近似球形，结果透明薄壳在胞体前端部位破裂，而后向细胞的后端方向脱出（图版 I ：12）。胞体内含色素颗粒，呈黄褐色；在横构附近的胞质中有一个红色眼点，个别细胞可看到两个；细胞趋光性较强，在培养中细胞常游向光较强的一侧。在用姬姆萨、盐基品红及Fuelgen反应等法专门作核的染色中，发现大多数细胞中含有两种类型的细胞核。大的核是涡鞭毛虫（甲藻）所固有的核（其特征是细胞周期的任何时间，核内始终地含有致密的染色体，几乎所有的涡鞭毛虫类都含有这种核，因其进化地位处于原核生物和典型真核生物之间，故称它们为中核生物——Mesokorryote，光薄甲藻的大核铺张的染色体如图版 I ：15所示）；小核则属于典型真核生物类型的核，这种小核一般在细胞中都处于间期核状态，且核内含有组蛋白，而涡鞭毛虫固有的大核是不含组蛋白，只含一种电泳迁移率近似组蛋白 H4的染色质碱性蛋白的。我们对光薄甲藻所作的初步生化检查，发现核的碱性蛋白中有组蛋白存在，因此核染色法所显示出的小核是属于典型真核生物类型的核。在光薄甲藻中，一般大核是一个(图版 I ：4、5、10和11，细胞周期所处时间不同而核的形态

上有些变化），但在细胞分裂期间一般可见到二个（图版Ⅰ：6、7和13），偶尔可见有三或四个（图版Ⅰ：8及9）；真核型小核一般见二个，少数见一个或三个（图版Ⅰ：5、7、10、11和13）。最早发现含两种不同类型核的涡鞭毛虫是叶状光甲藻（*Glenodinium foliaceum*, Doolge, 1971）及波罗底海多甲藻（*Peridinium balticum*, Tomas, 等1973），皆为海产种，第三个双核种是在我国无锡养鱼塘中发现的蓝色裸甲藻（*Gymnodinium cyaneum Hu* 李靖炎等，1979），是首次发现的含两种类型核的淡水甲藻，曾试人工培养但未成功。现在发现的光薄甲藻是第四个已发现的双核类型的涡鞭毛虫，也是第一个实验室人工培养成功的双核淡水甲藻。有关涡鞭毛虫的核或染色体的形态及化学组成方面，国外和我们实验室先后都做了一些工作，不在此详述。

（二）细胞的分裂繁殖　在培养的条件下，我们仅看到细胞通过无性的营养分裂方式进行繁殖，未曾见到产生配子的繁殖方式。一般成熟的营养体细胞进入分裂期时，细胞运动减慢，最后沉底，3—5小时内，胞体在近横沟位置的中间部位，逐渐凹陷，横裂形成两个子细胞（图版Ⅰ：2），偶尔也见到分裂产生四个子细胞（图版Ⅰ：3）。母细胞的透明外壳一经破裂，子细胞便被释放出来，大约六、七分钟，它们就会慢慢游动了。由于涡鞭毛虫固有的大核，始终存在致密的染色体，所以核的分裂并不经历通常真核生物那种从间期到中期的结构变化。我们看到的大核分裂过程是比较简单的，首先是细胞核中的染色体之间稍变疏松（这时核的体积也相应增大），然后在核的中间部位或稍偏一侧的地方凹陷、缢缩成二个核的，染色体似乎是“随机”地、且相等或不完全相等地被分配到新核中去（图版Ⅰ：6、7及13），在核分裂中未见到中心粒和纺錘丝出现。核分裂中染色体不等分配对后来形成的子细胞的正常发育似无关系，这是会跟涡鞭毛虫的染色体之间没有明显的结构和功能分化（Grell, 1964）有关，或则染色体数不足的核随后通过复制而被补足，多的则成为多倍体细胞的可能。关于小核的分裂将另作观察，不在此提及。

在单个细胞培养中，从一代接着一代繁殖的光薄甲藻看到第一次细胞分裂形成二个子细胞（个别形成四个子细胞），新生的子细胞经过24—36小时左右变成成熟细胞，又开始进行分裂，产生新的一代细胞，如此一代又一代地往下繁殖。据我们连续观察六代之中，每代间基本相距约24—36小时，表明光薄甲藻的分裂繁殖周期也就相当约24—36小时（平均室温约16°C的二月份下所观察，其他月份是否会有所变化，不详）。另外据单个细胞培养观察的结果，看到光薄甲藻的分裂和传代是倍增方式进行的，即一个原初的细胞分裂形成二个新的细胞，二个新细胞又进行分裂繁殖，便产生四个新的细胞，……如此不断进行分裂繁殖，以实现其种群的延续。在一个细胞进行分裂形成新的两个细胞以后，原来的这个“母细胞”便完全融合到新生的两个子细胞中去了，因此产生新的一代细胞后，一方面亲代已不复存在，而新生的子细胞却又都有同样的能力产生新的一代。这样的繁殖传代方式是跟高等动、植物和通过配子繁殖的细胞不同的。

（三）生长曲线测定　能进行扩大培养，而且各方面的条件比较稳定之后，便进行生长曲线的测定工作。细胞的计数参照血球计数法。用五个培养组同时进行。起始培养的细胞浓度为1万个/毫升，每日定时计数，直到第12天。结果所得到的生长曲线如图1所示。其对数生长期是在培养开始后的第1—3天；生长高峰在第5天；相对静止期是

在第6—10天；以后随营养的耗竭，细胞衰退死亡，或形成囊胞。根据光薄甲藻的细胞增殖高峰在第五天，随后又开始下降，因此为了能使细胞生长繁殖处于最佳状况或达到大量地不断增殖的目的，就应该适时地每隔5天左右补加一次培养液，其量一般可为原培养液的2—3倍体积。



图1 光薄甲藻（*Glenodinium gymnodinium Penard*）的生长曲线

结　语

淡水涡鞭毛虫（甲藻）人工培养比较困难，显然是它们对环境条件的一些因素有着严格的要求有关，没有满足这些因素，它们就不能生长繁殖，而且因种不同而所要求的因素也会不同。在野外自然条件下，在不同的地点、不同的季节出现不同的甲藻种类，这是一个例证，我们也发现原来出现某种甲藻的地点和季节皆不变，但第二年就再找不到这种甲藻的情况。这表明基本的条件相同，但环境中的某些因素发生稍微的变化而影响了该甲藻的生存，反过来也说明淡水甲藻对环境条件的适应能力是比较差的。所以为淡水甲藻设计或选择一个十分合适的人工培养液是很困难而又非常重要的问题。现在光薄甲藻之所以能够培养成功，是跟稍改良地应用了原用于培养团藻的这个人工培养基有关，另外也与我们吸取了一些以往的经验而把培养工作分初步培养、纯化培养和扩大培养三个阶段进行也有一定的关系。对于所进行的培养工作，我们主要是着眼于培养的对象能在人工培养的条件下存活，并生长、繁殖和传代，所以有关培养的很多问题尚待进一步观察和分析。可幸的是我们在试探培养中，不但比较成功地培养出了一种淡水涡鞭毛虫，而且它又是稀有的双核种类，这对有些重要的理论问题的研究将会是很有意义的。

李炳炎 乔以焖 陈向虹 张慧绮 1979 一种双核兰裸甲藻。科学通报，461—462。

Dodge, J. D 1971 A Dinoflagellate, with both a mesocaryotic and an eucaryotic nucleus. *Protoplasma* (wein) 73, 145—157.

Grell, K. G 1964 The protozoan nucleus. in The Cell, Vol. VI. p. 1—79. Acad. Press., New York.

Provasoli, L., McLaughlin, J. J. A. and Droop, M. R. 1957 The development of artificial media for marine algae. *Arch. Microbiol.* 25, 392—428.

Provasoli, L. and Pintner, I. J. 1959 Artificial media for freshwater algae; problems and suggestions. In Tryon, C. A. & hartman, R. T. (Eds.) *The Ecology of Algae.* Special Publication No. 2. Pymatuning Laboratory of Field Biol. University Pittsburgh, 84—96.

Tomas, R. A., Cox, E. R. and Steidinger, K. A. 1973 *Peridinium balticum* (Levander) Lemmennam, an unusual dinoflagellate with a mesocaryotic and an eucaryotic nucleus. *J. Phycology* 9, 91—98.

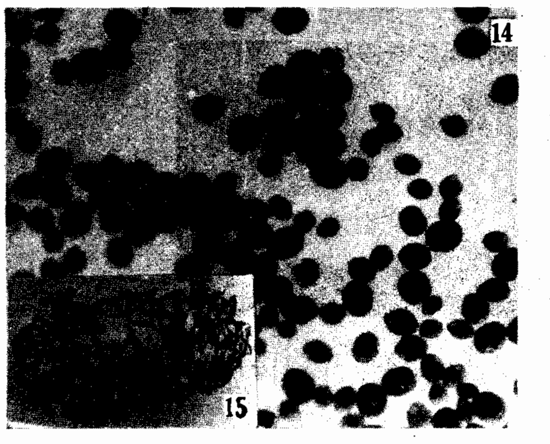
THE SUCCESSFUL CULTURE OF A FRESH-WATER DINOFLAGELLATE

Zhou Xingliang Chen Yunhe Song Chengrong
(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

In November 1981, we collected a fresh-water dinoflagellate—*Glenodinium gymnodinium Penard* from a pool in the suburbs of Kunming. We have succeeded in the culture of this organism in the laboratory. The medium used is a modified artificial medium for growing Volvox globartor, devised by Provasoli and Pintner (1959). The process of culture is divided into three steps: (1) preliminary culture; (2) pure culture and (3) expand culture. The work is carried out under 8—12 hours illumination each day (the intensity of illumination is at 800—1200 Lux) and at temperature 9—26°C in the common laboratory. So far, the culture of these cells has been carried to more than 300th progeny. After the culture, we also observed the reproduction form, the growth curve and nuclei of this dinoflagellate. The result showed this organism is a rare dinoflagellate both with a mesocaryotic and an eucaryotic nucleus.

周理良等：一种淡水涡鞭毛虫人工培养成功

Zhou Xingliang et al.: The Succesful Culture of a Fresh-Water Dinoflagellate



图版Ⅰ

1.正常的光薄甲藻（Glenodinium gymnodinium Penard）的细胞外形； 2.一个营养体细胞正在分裂形成二个子细胞； 3.一个营养体细胞正在分裂形成四个子细胞，旁边的一个小细胞为另外分裂的细胞所释放出的； 4.只含一个涡鞭毛虫固有的大核的细胞；5、6、7、10、11和13各含一个或二个涡鞭毛虫固有的大核及1－3个真核生物型小核的细胞，其中5、10的细胞核属欲分裂前之状态； 6、8的核已分裂开；13的核正在分裂，明显可见染色体将不等分配到子核中去； 8及9为大核被分裂成3及4个，但未见有小核；15.涡鞭毛虫固有的大核铺张的染色体。12.一个正在脱壳的细胞；14.在活动情况下拍的纯培养细胞。 1、2、3、12及14为活体照片；其余的核及染色体为盐基品红或姬姆萨染色。图12放大450×，图14放大160×，其余放大890×。